

ANTI-GPIIb/IIIa REKOMBINANTE ANTIKÖRPER

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine und für antiidiotypische Antikörper kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von Krankheiten.

10

15

20

25

30

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP) IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B. Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990), 83-95).

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.

Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plättchenzahlen aufweisen, wird als Notfallbehandlung die Verabreichung hoher Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.

Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.

Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthenischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper. Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab. Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h. Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt, daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Autoantikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assoziiierter Autoantikörper in AITP führen.

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen
5 rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8
10 (Autoantikörper) bzw. SEQ ID No. 9 bis 18 (antiidiotypische Antikörper) dargestellt.

I. Autoantikörper

15 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Autoantikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 20 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
25 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und
- 30 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)

5 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
10 einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
15 CDR2-Region ausgewählt:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
20 V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)
kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
25 kodiert.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für
die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder
ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 30 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
A T W D D G L N G P V (VII)

- 6 -

- kodierenden Nukleotidsequenz,
(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A A W D D S L N G W V (VIII)

- 5 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert und
(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
10 einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
CDR1-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
15 S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,
(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz und
20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)
kodiert.

- 25 Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise
weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XII)
kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5

II. Antiidiotypische Antikörper

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für antiidiotypische Antikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit
10 eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIII)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
D G R S G S Y A R F D G M D V (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer für die Aminosäuresequenz:
20 M G S S V V A T Y N A F D I (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 25 (e) einer für die Aminosäuresequenz:
L R N D G W N D G F D I (XVII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (f) einer für die Aminosäuresequenz:
D S E T A I A A A G R F D I (XVIII)
30 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (g) einer für die Aminosäuresequenz:
E D G T T V P S Q P L E F (XIX)

kodierenden Nukleotidsequenz,
 (h) einer für die Aminosäuresequenz:
 G S G S Y L G Y Y F D Y (XX)

kodierenden Nukleotidsequenz,
 5 (i) einer für die Aminosäuresequenz:
 G L R S Y N Y G R N L D Y (XXI)

kodierenden Nukleotidsequenz,
 (j) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
 einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
 10 mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c)
 oder (d) kodiert und

(k) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
 einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen
 GPIIb/IIIa kodiert.

15

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine
 CDR1-Region ausgewählt aus: einer für die in Tab. 7a gezeigten Amino-
 säuresequenzen N F A M S, S Y T M H, D Y A L H oder S H Y W S
 kodierenden Nukleotidsequenz, einer für die Aminosäuresequenz T Y Y W
 20 S kodierenden Nukleotidsequenz, einer für die in Tab. 7b gezeigten
 Aminosäuresequenzen D Y G M H, S H T I S, K Y A I H oder E L S M H
 kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine
 Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und
 vorzugsweise mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäurese-
 25 quenzen kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
 CDR2- Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7a gezeigten Aminosäu-
 resequenzen G I S G G G L L T H Y A (D/N) S V K G, L I S Y D G S N K Y
 30 Y A D S V K G, G I S W D S T S I G Y A D S V K G oder F I Y D G A R T
 R F N P S L R S kodierenden Nukleotidsequenz, einer für die Aminosäurese-
 quenz Y I Y Y S G N T N Y N P S L K S kodierenden Nukleotidsequenz, einer für die

in Tab. 7b gezeigten Aminosäuresequenzen A I S Y D G S N K Y Y A D S
V K G, G I T P I F G T V N Y A Q K F Q G, A I S S N G G N T Y Y A D S
V K G oder G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G kodierenden Nukleotidse-
quenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
5 einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens
90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure,
die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat
10 oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt
aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
C S Y V H S S T N (XXII)
15 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
Q V W D N T N D Q (XXIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
20 einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert
und
- (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
25 einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen
GP1Ib/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine
CDR1-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7a gezeigte Aminosäure-
sequenz T G T S S A I G N Y N F V P kodierenden Nukleotidsequenz, einer
30 für die in Tab. 7b gezeigte Aminosäuresequenz G G Y K I G S K S V H
kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine
Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und

vorzugsweise von mindestens 90% zur der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

5 Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7a gezeigte Aminosäuresequenz E G S K R P S kodierenden Nukleotidsequenz, einer für die in Tab. 7b gezeigte Aminosäuresequenz E D S Y R P S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und
10 vorzugsweise mindestens 90% zu der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu
15 verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und gegebenenfalls zusammen mit der jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie
20 der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivat eine Bindungskonstante von mindestens 10^{-6} l/mol, vorzugsweise von mindestens 10^{-8} l/mol für das jeweilige Antigen auf.

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers
25 kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder
30 Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen Domänen der H- und L-Kette oder einer oder zwei H-Kettendomänen sowie gegebenenfalls einer konstanten Domäne zusammengesetzt sein können.

Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun, Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.

5

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epitoperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook
15 et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder ein Phage.

20 Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft
25 insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen
30 Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugierzelle) sein. Beispiele für

geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

10 Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B.
20 ein Fab-, $F(ab)_2$ -, Fab'- oder $F(ab')_2$ Fragment) sein. Vorzugsweise ist der Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder
25 Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer
30 Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungsgemäßen Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten

Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageimid-Bibliothek aus einem gesunden humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

5 Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

10

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung
15 ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation umfassen, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid als Antikörper
20 exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen
25 oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann
30 beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungsgemäße Autoantikörper-Polypeptid einem Patienten verabreicht werden,

wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen Immunisierungsprotokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996), 1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121; 5 Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden. Das erfindungsgemäße antiidiotypische Antikörper-Polypeptid kann einem Patienten verabreicht werden, um eine direkte Hemmung der Autoantikörper-Aktivität 10 zu erreichen.

Untersuchungen der erfindungsgemäßen Autoantikörper-Polypeptide zeigten, daß diese überraschenderweise in der Lage sind, die Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen zu hemmen. Die erfindungsgemäßen Auto- 15 antikörper-Polypeptide und antiidiotypischen Antikörper-Polypeptide können daher gegebenenfalls in Kombination als Mittel zur Modulation der Blutgerinnung eingesetzt werden, insbesondere zur Verhinderung einer Thrombose, beispielsweise nach Herzinfarkten, Schlaganfällen oder bei venösen Thrombosen mit Lungenembolien oder Ischämien etc.

20 Bisher wurden für therapeutische Zwecke als Fibrinogenantagonisten murine monoklonale Antikörper, z.B. der monoklonale Antikörper 7E3 (vgl. z.B. US-Patent 5,440,020) oder Fragmente davon (z.B. das kommerziell erhältliche Fab Fragment ReoPro®) oder kurze synthetische Peptide eingesetzt. Murine 25 monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente haben jedoch den Nachteil, daß sie bei der Behandlung von humanen Patienten aufgrund ihrer Immunogenität zu unerwünschten Nebenreaktionen führen, während kurze Peptide im allgemeinen sehr schnell abgebaut werden. Gegenüber diesen bekannten Mitteln haben die erfindungsgemäßen Polypeptide den Vorteil, 30 daß sie aus Aminosäuresequenzen humanen Ursprungs bestehen und daher geringere unerwünschte Nebenwirkungen als entsprechende murine

Antikörper oder Antikörperfragmente aufweisen, und daß sie aufgrund ihrer Größe nicht einem so schnellen Abbau wie Peptide unterliegen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer für ein Autoantikörper-Polypeptid kodierenden Nukleinsäure, eines dieser Nukleinsäure enthaltenden Vektors, einer mit der Nukleinsäure oder dem Vektor transformierten Zelle, eines von der Nukleinsäure kodierten Polypeptids oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine oder mehrere der genannten Substanzen enthält, zur Herstellung eines Mittels für die Beeinflussung und insbesondere die Hemmung der Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen. Vorzugsweise wird das Mittel zur Modulation der Blutgerinnung eingesetzt, insbesondere für die Auflösung von Thromben oder/und für die Prävention der Thrombenbildung. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann nach bereits für murine Antikörper oder Antikörperfragmente etablierten Protokollen erfolgen.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von Phagemid-Klonen, die Nukleinsäuren exprimieren, die für Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa oder für gegen diese Autoantikörper gerichtete antiidiotypische Antikörper kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Phagemid-Bibliothek aus Lymphozyten eines humanen Spenders herstellt und die gewünschten Phagemid-Klone durch Affinitätsselektion, umfassend negative und positive Selektionsschritte gewinnt. Vorzugsweise beinhaltet das Verfahren außerdem, daß man Antikörperkodierende Nukleinsäuren aus den Klonen gewinnt oder/und daß man die Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren zur Expression von rekombinanten Antikörperketten, Derivaten oder Fragmenten davon verwendet.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele, Figuren und Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen:

- 5 SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßigen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei
Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplement-
bestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von
bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-
291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357
10 reicht,
- SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 darge-
stellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30,
CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von
15 A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-
108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,
- SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßigen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1
20 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-
144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261,
CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,
- SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angege-
benen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20,
25 CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von
A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98
und FR4 von A.S. 99-11 reicht,
- 30 SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßigen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp

106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

SEQ ID No. 6

5

die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

10

SEQ ID No. 7

die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

15

SEQ ID No. 8

die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-111 reicht,

20

SEQ ID No. 9

die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-288, CDR3 von bp 289-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

25

SEQ ID No. 10

die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 9 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-96, CDR3 von A.S. 97-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

30

- 5 SEQ ID No. 11 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon Al-X16), wobei
FR1 von bp 1 bis 60, CDR1 von bp 61-102, FR2 von bp
103-147, CDR2 von 148-168, FR3 von bp 169-264,
CDR3 von 265-291 und FR4 von bp 292-375 reicht,
- 10 SEQ ID No. 12 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 11 darge-
stellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20,
CDR1 von A.S. 21-34, FR2 von A.S. 35-49, CDR2 von
A.S. 50-56, FR3 von A.S. 57-88, CDR3 von A.S. 89-97
und FR4 von A.S. 89-125 reicht,
- 15 SEQ ID No. 13 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon Al-X20), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp
106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291,
CDR3 von von bp 292-333 und FR4 von bp 334-366
reicht,
- 20 SEQ ID No. 14 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 13 dargestell-
ten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1
von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S.
50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-111
und FR4 von A.S. 112-122 reicht,
- 25 SEQ ID No. 15 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-
gemäßen Polypeptids (Phagemidklon Al-X39), wobei
FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp
106-147, CDR2 von pb 148-198, FR3 von bp 199-294,
30 CDR3 von bp 295-339 und FR4 von 340-372 reicht,

5 SEQ ID No. 16 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 15 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

10 SEQ ID No. 17 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X40), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-297, CDR3 von bp 298-339 und FR4 von bp 340-372 reicht,

15 SEQ ID No. 18 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 17 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-99, CDR3 von A.S. 100-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

20 SEQ ID No. 19 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X2), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von bp 292-327 und FR4 von bp 328-360 reicht,

25 SEQ ID No. 20 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 19 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-109 und FR4 von A.S. 110-120 reicht,

30 SEQ ID No. 21 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-B14), wobei

- 20 -

FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht;

5

Es wurden auch folgende Variationen der Sequenz gefunden: An Position 7 kann ein C, an Position 9 ein G, an Position 13 ein G, an Position 15 ein G, an Position 91 ein A, an Position 92 ein G, an Position 98 ein C, an Position 149 ein T, an Position 205 ein A, an Position 228 ein A, an Position 251 ein A, an Position 253 ein T oder/und an Position 284 ein A vorliegen. Dies hat in der Aminosäuresequenz (vgl. SEQ ID No. 22) zur Folge, daß an Position 3 ein Q, an Position 5 ein V, an Position 31 ein S, an Position 33 ein A, an Position 50 ein V, an Position 69 ein T, an Position 76 ein K, an Position 84 ein N, an Position 85 ein S oder/und an Position 95 ein Y vorliegen kann.

10

15

SEQ ID No. 22

20

die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 21 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

25

SEQ ID No. 23

die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-B18), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-333 und FR4 von bp 334-366 reicht;

30

Es wurden auch folgende Variationen der Nukleotidsequenz gefunden: So kann an Position 7 ein C, an

Position 13 ein G, an Position 16 ein C, an Position 56 ein A, an Position 94 ein T, an Position 97 ein G, an Position 155 ein T, an Position 173 ein C, an Position 223 ein T, an Position 252 ein T oder ein C, an Position 261 ein G, an Position 267 ein G, an Position 271 ein A, an Position 275 ein C oder/und an Position 277 ein G vorliegen. Dies hat in der entsprechenden Aminosäuresequenz (vgl. SEQ ID No. 24) zur Folge, daß an Position 3 ein Q, an Position 5 ein V, an Position 6 ein Q, an Position 19 ein K, an Position 32 ein Y, an Position 33 ein A, an Position 52 ein I, an Position 58 ein A, an Position 75 ein S, an Position 84 ein S, an Position 87 ein R, an Position 89 ein E, an Position 91 ein T, an Position 92 ein A oder/und an Position 93 ein V vorliegen kann.

SEQ ID No. 24 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 23 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-111 und FR4 von A.S. 112-122 reicht,

SEQ ID No. 25 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-B24), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-330 und FR4 von bp 331-363 reicht;

Es wurden auch folgende Variationen der Nukleotidsequenz gefunden: An an Position 7 kann ein C, an Position 9 ein G, an Position 13 ein G, an Position 15 ein G, an Position 31 ein G, an Position 46 ein A, an

- 22 -

Position 67 ein G, an Position 89 ein G, an Position 92 ein G, an Position 93 ein C, an Position 98 ein G, an Position 102 ein G, an Position 140 ein G, an Position 141 ein G, an Position 145 ein G, an Position 149 ein T, an Position 157 ein T, an Position 158 ein A, an Position 160 ein G, an Position 166 ein A, an Position 173 ein A, an Position 235 ein T, an Position 251 ein A, an Position 290 ein C oder/und an Position 293 ein A vorliegen. Dies hat in der entsprechenden Aminosäuresequenz (vgl. SEQ ID No. 26) zur Folge, daß an Position 3 ein Q, an Position 5 ein V, an Position 11 ein V, an Position 16 ein R, an Position 23 ein A, an Position 30 ein S, an Position 31 ein S, an Position 33 ein G, an Position 34 ein M, an Position 47 ein W, an Position 49 ein A, an Position 50 ein V, an Position 53 ein Y, an Position 54 ein D, an Position 56 ein S, an Position 58 ein K, an Position 79 ein L, an Position 84 ein N, an Position 97 ein A oder/und an Position 98 ein K vorliegen kann.

SEQ ID No. 26

die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 25 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-110 und FR4 von A.S. 111-121 reicht,

SEQ ID No. 27

die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-B24), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-96, FR2 von bp 97-138, CDR2 von bp 139-159, FR3 von bp 160-255, CDR3 von bp 256-282 und FR4 von bp 283-366 reicht;

Es wurden auch folgende Variationen der Nukleotidsequenz gefunden: An Position 4 kann ein C oder ein T, an Position 37 ein G, an Position 40 ein A, an Position 50 ein G, an Position 67 ein A, an Position 72 ein T, an Position 133 ein A, an Position 136 ein T, an Position 138 ein T oder ein C, an Position 148 ein G, an Position 160 ein T, an Position 161 ein T, an Position 162 ein T oder ein C, an Position 200 ein C, an Position 217 ein T, an Position 218 ein G, an Position 220 ein A oder C, an Position 269 ein G, an Position 271 ein T, an Position 272 ein G, an Position 275 ein G oder/und an Position 282 ein T oder ein C vorliegen. Dies hat zu Folge, daß in der entsprechenden Aminosäuresequenz (vgl. SEQ ID No. 28) an Position 2 ein L, an Position 13 ein G, an Position 14 ein K, an Position 17 ein R, an Position 23 ein N, an Position 24 ein N, an Position 45 ein I, an Position 47 ein Y, an Position 50 ein D, an Position 54 ein F, an Position 67 ein T, an Position 73 ein S, an Position 74 ein R, an Position 90 ein S, an Position 91 ein S, an Position 92 ein S oder/und an Position 94 ein H vorliegen kann.

SEQ ID No. 28 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 27 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 20, CDR1 von A.S. 21-32, FR2 von A.S. 33-46, CDR2 von A.S. 47-53, FR3 von A.S. 54-85, CDR3 von A.S. 86-94 und FR4 von A.S. 95-122 reicht,

SEQ ID No. 29 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-B38), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp

106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-333 und FR4 von bp 334-366 reicht;

Es wurden auch folgende Variationen der Nukleotidsequenz gefunden: Es kann an Position 7 ein C, an Position 9 ein G, an Position 13 ein G, an Position 15 ein A oder/und an Position 16 ein C vorliegen. Dies hat zu Folge, daß in der entsprechenden Aminosäuresequenz an Position 3 ein Q, an Position 5 ein V oder/und an Position 6 ein Q vorliegen kann und

SEQ ID No. 30 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 29 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-111 und FR4 von A.S. 112-122 reicht,

Figur 1 die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs (PDG-X) an GPIIb/IIIa durch Zusatz des antiidiotypischen Antikörper-Phab AI-X17.

Figur 2 die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs (PDG-B) an Blutplättchen durch antiidiotypische Antikörper-Phabs AI-B,

Figur 3 die Bindung von Autoantikörper-Phabs an unbehandelte und EDTA-behandelte Blutplättchen,

Figur 4 die Hemmung der Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa durch Autoantikörper-Phabs,

Figur 5-7 die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs an GPIIb/IIIa durch den Antikörper 7E3 und das Antikörperfragment ReoPro®.

5 Beispiele

1. Identifizierung von Autoantikörpersequenzen

1.1. Gewinnung von Autoantikörpern

10

Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl
15 pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30 min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

20

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch (Plättchenzahl $< 150 \times 10^9/l$) und hatten normale oder vergrößerte Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren Formen der Immunthrombozytopenie.

1.2. Gewinnung gereinigter Antigene

25

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51 und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

30

1.3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting

Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humander Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.

Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

1.4. Monoklonale Antikörper

Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexierte Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene gewonnen und sind nicht AITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

1.5. Phagemid-Bibliothek

Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer

für die PCR-Amplifikation der H- und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helferphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119) beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylenglykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält 1×10^7 Spezifitäten.

1.6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative Selektion) mit 5×10^7 thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit 10^8 normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay ermittelt. 1 μ l normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 ml) sowie gereinigtes GPIIb/IIIa (500 μ g/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1% Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- α -

- 28 -

naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nachgewiesen.

5

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftropfen getestet.

10

Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffinität für GPIIb/IIIa aufweisen.

15

1.7. Fab Analyse

20

Zum Test der positiven Phabs auf kappa (κ), lambda (λ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- λ -, κ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemielumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf κ , λ und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der λ -Kette in allen Klonen.

25

30

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis 3×10^4 Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

1.8. Charakterisierung der Phab-Bindeepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1 μ l aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen (10^9 /ml), gereinigtes GPIIb/IIIa (500μ g/ml), ein Peptidfragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690, 500μ g/ml) und der cytoplasmatische Abschnitt von GPIIb/IIIa (500μ g/ml) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone (0,4 μ g/ml Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper (1 μ g/ml) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- σ -naphthol nachgewiesen.

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert \pm SD in %)				
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n = 5)		Gruppe B Phab Klone (n = 10)	
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa
(1) Anti-GPIIB	0	0	49,1 \pm 5,9	49,4 \pm 9,2
(2) Anti-GPIIIa	0	0	0	0
(3) Anti GPIIb/IIIa-Komplex	77,8 \pm 2,9	43,6 \pm 2,1	58,6 \pm 4,4	45,5 \pm 8,0
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 \pm 7,7	33,0 \pm 10,8	95,9 \pm 2,7	97,5 \pm 7,5

1.9. Inhibierungsuntersuchungen

Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsuntersuchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifizierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.

Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosestreifen getropft und die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit 10^{11} Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nachgewiesen.

Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis 60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs. Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von Patienten mit primärer und krankheitsassoziiert AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
AITP-Patient	Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klone
5 WS16	13	19	40
WS37	14	20	36
KC	24	22	28
KK	22	22	40
KP	10	36	60
10 WS2	25	55	65
KS	60	56	64
KL	0	15	10
KG	0	0	0
KM	0	0	0
15 KE	0	0	0
KR	0	0	0

1.10. DNA Sequenzanalyse

- 20 Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

- 33 -

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenziersystem unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Chy1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'). Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: Cλ (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), Cκ (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und Vλ Familien zugeordnet.

Die VH und Vλ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzidentität mit dem Stammlinien VH4.11 der V_H4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V_H3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammliniensequenz der DPL2 der V_L1 Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 23 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

- 34 -

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH4.11	QVQLQESGPGLVKPSSETLGLTCTVSGGIS	SYVHS	WIRQPEKGLHIG	YIYSGSTNYPNLSKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAQTAVYYCAR	VLPEDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG7	--K-L-----N-----R----	G-S-R	-----S-----	D-S-----K-K---R-	---L-----N-----	VLPEDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	VLPEDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	VLPEDPISHDV	HGKGTITVTSS
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	VLPEDPISHDV	HGKGTITVTSS
1.9111	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGTFIS	SYGHII	HVRQAPKGLHWA	VISYDGSNKYYADSVKG	RTTISRDNKRITLYLQHMISLRADTAVYYCAK	ALGSKGGHDIYHDV	HGKGTITVTSS
PDG13	--K-L-----	--A--	-----	-----	--A-----	ALGSKGGHDIYHDV	HGKGTITVTSS
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSKGGHDIYHDV	HGKGTITVTSS
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSKGGHDIYHDV	HGKGTITVTSS
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	ALGSKGGHDIYHDV	HGKGTITVTSS
M85255	--Q-V-----	-----	-----	-----	--T-----	DRPTARMTYGGHDV	HGQGTITVTSS

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL2	VLTQPPSASGTPGQIVTISC	SGSSNIGSNTVN	HYQQLPGTAPKLLIY	SINQRFS	GVPRFSGSKGTSASLAIISGLQSEDEADYYC	AAHDDSLIG	FGGGTKLTVLQSP
PDG7	-V-----H-----	--R--P-S	--II-V-----F	GSII-----	-----R---G-AG---	-T---G---PV	FGGGTKLTVLQSP
PDG8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
DPL2	VLTQPPSASGTPGQIVTISC	SGSSNIGSNTVN	HYQQLPGTAPKLLIY	SINQRFS	GVPRFSGSKGTSASLAIISGLQSEDEADYYC	AAHDDSLIG	FGGGTKLTVLQSP
PDG13	-V-----	-----	-----	-----	-----	-----HW	FGGGTKLTVLQSP
PDG17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG31	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP
PDG37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	FGGGTKLTVLQSP

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9111; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIIb-Autoantikörpers 2E7 (Kunicki et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

PDG- Phab- Klone	Schwere Kette			Leichte Kette		
	V _H Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V _L Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)
Gruppe A: 7,8, 10, 16	V _H 4	V _{H4} .11	84,3	V _L I	DPL2	81,4
Gruppe B: 13, 17,31, 37	V _H 3	1,9III	95,1	V _L I	DPL2	97,1

2. Identifizierung von antiidiotypischen Antikörpersequenzen

2.1 Phab-Klone AI-X

Nach der in Beispiel 1 angegebenen Methode wurden durch die Phagemid-technik Sequenzen für antiidiotypische Antikörper identifiziert. Dabei wurde der in Beispiel 1 selektionierte Klon PDG16 als Antigen verwendet. Eine negative Vorselektion fand nicht statt.

Es wurde ein Pool von kombinatorischen Phab-Bibliotheken, die Spezifitäten einer nichtimmunen und einer mit roten Blutzellen immobilisierten Bibliothek peripherer B-Lymphozyten und einer nichtimmunen Bibliothek von B-Lymphozyten aus Tonsillen verwendet.

- 37 -

Der nach der vierten Panningrunde erhaltene Pool von Phabs wurde analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität ermittelt. 25 der ausgewählten Klone reagierten mit Anti-GPIIb/IIIa-Phab. Diese antiidiotypischen Phab-Klone gehörten zu zwei Gruppen: Gruppe I (drei Klone) zeigte eine Reaktion ausschließlich mit Autoantikörper-Phab-Klonen der Gruppe A (PDG 7, 8, 10 und 16), während die Phab-Klone der Gruppe II (insgesamt 22 Klone) sowohl mit Phab-Klonen der Gruppen A und B, mit murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern, mit gereinigtem Serumimmunglobulin (IVIgG) oder F(ab')₂ Fragmenten davon und mit Anti-IgE-Fab reagieren. 14 Phab-Klone (Gruppe III) reagierten mit keiner der genannten Substanzen. Ein Phab-Klon der Gruppe IV reagierte nur mit Anti-GPIIb/IIIa Antikörpern. Die Ergebnisse dieser Spezifitätsuntersuchungen sind in Tabelle 5a zusammengefaßt.

Eine DNA-Sequenzanalyse von Phab-Klonen der Gruppe I (AI-X16, 17 und 24) zeigte in den für die schwere Kette kodierenden Sequenzen eine bis auf eine Aminosäure in der CDR2 Region vollständige Identität und in den für die leichte Kette kodierenden Sequenzen eine vollständige Identität. Ein Vergleich mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen zeigte ca. 85% Homologie zur H-Ketten-Sequenz VH3 und ca. 90% Homologie zur Sequenz der L-Kettenfamilie V- λ II. Von den Phab-Klonen der Gruppen II, III und IV wurde eine DNA-Sequenzanalyse des H-Kettengens jeweils an einem Vertreter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse und des Vergleichs mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen ist in den Tabellen 6 und 7a zusammengefaßt.

Das Ergebnis einer Inhibitionsuntersuchung ist in Fig. 1 dargestellt. Die Hemmung der Bindung von AI-X17 an PDG-A durch gereinigtes GPIIb/IIIa wurde durch einen Immunodotassay bestimmt. 660 bzw. 220 ng PDG-A Phab wurden auf Nitrozellulose gegeben. Das Antigen wurde für 2 h mit GPIIb/IIIa in Konzentrationen im Bereich von 50 μ g/ml bis 50 ng/ml sowie mit einer Pufferlösung als Kontrolle und dann für zwei weitere Stunden mit

- 38 -

dem Phagenklon AI-X17 (Endkonzentration 10^{12} /ml) inkubiert. Die gebundenen Phagen wurden mit Peroxidase-konjugiertem polyklonalen Kaninchen-Anti-Phage Antikörper und Elektrochemilumineszenz nachgewiesen.

5 Es wurde gefunden, daß der Phab AI-X17 (Gruppe I) die Bindung von Autoantikörper-Phabs der Gruppe A (PDG-X) an das Glykoprotein IIb/IIIa hemmen kann. Dies bedeutet, daß AI-X17 die antigenbindende Stelle auf PDG-A erkennt.

10 Ein weiterer Klon AI-X2, der an PDG-A bindet, wurde sequenziert. Dieser Klon hat - wie auch die Klone AI-X20, 39 und 40 - nur eine schwere, aber keine leichte Kette. Die schwere Kette kann alleine, gegebenenfalls als Dimer, mit ausreichender Spezifität und Affinität an das Antigen, d.h. PDG-A, binden.

15

2.2 Phab-Klone AI-B

Nach der in Beispiel 2.1 angegebenen Methode wurden durch die Phagemid-Technik Sequenzen für weitere antiidiotypische Antikörper identifiziert.
20 Dabei wurde ein in Beispiel 1 selektionierter Klon PDG-B als Antigen verwendet.

Es wurden insgesamt 40 Phab-Klone ausgewählt und ihre Bindespezifität ermittelt. 34 der ausgewählten Klone reagierten mit Anti-GPIIb/IIIa-PHAB.
25 Diese antiidiotypischen Phabklone gehörten zu drei Gruppen:

Gruppe I (14 Klone) zeigte eine Reaktion ausschließlich mit Autoantikörper-Phab-Klonen der Gruppe B, während die Phab-Klone der Gruppe II (insgesamt 8 Klone) sowohl mit Phab-Klonen der Gruppen A und B reagierten.
30 Die Phab-Klone der Gruppe III (insgesamt 12 Klone) reagierten darüber hinaus mit murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern, mit gereinigtem Serumimmunglobulin (IVIgG) oder $F(ab')_2$ -Fragmenten davon und mit

Anti-IgE-Fab. Sechs Phab-Klone (Gruppe IV) reagierten mit keiner der genannten Substanzen. Die Ergebnisse dieser Spezifitätsuntersuchungen sind in Tabelle 5b zusammengefaßt.

- 5 Das Ergebnis einer DNA Sequenzanalyse von Phab-Klonen der Gruppe I (AI-14, 18, 24 und 38) ist in den Tabellen 6 und 7b zusammengefaßt. Die Klone AI-B14, 18 und 38 haben nur eine schwere Kette.

10 AI-B14 und 17 sind identisch. Ebenso sind AI-B34 und 40 mit AI-B18 identisch.

Die Hemmung der PDG-B-Bindung an Plättchen durch AI-B-Phabs wird in Fig. 2 dargestellt. Die Bestimmung erfolgte mittels durchflußzytometrischer Analyse. Hierzu wurde ein an Plättchen reiches Plasma (insgesamt 10^7 Plättchen) mit biotinyliertem PDG-B in Gegenwart oder Abwesenheit von AI-B Phabs und unter Verwendung von Helferphagen als Kontrolle inkubiert. Die Plättchen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und gebundenes PDG-B wurde mit R-Phycoerythrin (RPE)-markiertem Streptavidin nachgewiesen. 10.000 Vorgänge wurden in einem FACScan-Gerät gezählt und der mittlere Wert der Fluoreszenz (\pm SD) wurde aufgezeichnet. Die stärkste Inhibierung (> 60%) wurde mit den Klonen AI-B18, 24 und 38 erzielt. Die Hemmung der Bindung zeigt eine Wechselwirkung von AI-B Klonen mit der Antigenbindenden Stelle auf PDG-B.

Tabelle 5a

Bindung an

AIX Phab-Klone	PDGA	PDGB	anti-IgE-Fab	anti-GPIIb/IIIa mAb	SG	F(ab') ₂
Gruppe I						
16,17,24	3	+	-	-	-	-
Gruppe II						
1,2,3,4,5,6,7,9, 11,13,14,23,26, 27,28,29,33,35, 36,37,38,40	22	+	+	+	+	+
Gruppe III						
8,10,12,15,18, 19,21,22,25,30, 31,32,34,39	14	-	-	-	-	-
Gruppe IV						
20	1	-	-	+	-	-

Tabelle 5b

AI-B		Bindung an			
Phab-Klone					
		PDG-X	PDG-B	anti-IgE-Fab anti-GPIIb/IIIa mAb	IvlgG IvlgG F(ab') ₂
14 (AI-B5,7,8,14,17,18,23 24,30,31,33,34,38,40)	-	+	-	-	-
	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-

Tabelle 6

anti-Id phage clones

antiidiotypische Phab-Klone (AI-X und AI-B)	V _H			V _λ		
	Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%) *	Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%) *
AI-X16, AI-X24	V _H 3	DP47	88	V _λ 2	DPL10	88
AI-X17	V _H 3	DP47	87	V _λ 2	DPL10	88
AI-X39	V _H 3	DP49	94	-	-	-
AI-X40	V _H 3	DP31	95	-	-	-
AI-X20	V _H 4	DP71	78	-	-	-
AI-B14, AI-B17	V _H 3	DP46	91	-	-	-
AI-B18	V _H 1	DP10	85	-	-	-
AI-B24	V _H 3	DP49	81	V _λ 3	3h	82
AI-B38	V _H 1	DP5	98	-	-	-

20 * Höchste Homologie (in %) der Aminosäuresequenzen der jeweiligen Phab-Klone zu Sequenzen von bekannten Stammlinien-V-Genen

Tabelle 7a

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGSTYYADSVKG	RTISRDNISKNTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAK	VRDLGVRLSTETEDI	HGQGTQTVTVSS
AIX16	Q-K-----H-----D	NF---	-----	G--G-LL-H-----	---N--R--V-----	-----	-----
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DP49	QVQLVESGGGVQPGGSLRLSCLASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG	RTISRDNISKNTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAK	DGRSGSYAREDGMDV	HGQGTQTVTVSS
AIX39	--K-L-----H-----	--T--	-----	L-----	--A-----K-----	-----	-----
DP31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFD	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISHNSGSIQYADSVKG	RTISRDNISKNTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAK	MGSSVWATYHAFDI	HGQGTQTVTVSS
AIX40	Q-K-L-----	---L-	-----	---D-T-----	-----V--	-----	-----
DP71	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS	SYVWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKIQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	DADGDGFSPYYFPY	HGQGIPIVSVSS
AIX20	--K-L-----DV--R	-H---	-L-----	F--DGAR-RE---R-	--SL-M-P-K-----G-----S-----	-----	-----

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL10	QSALTQPAVSVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	EVSRRPS	GVSIRFSGSKGHTASLTISGLQAEADYYC	CSYNGSSTF	-----
AIX16	VV-----	---AI-N--F-P	-----	-G-----	---E-----	---VII---N	HWEGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

25

FR: Framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (DP47, DP49, DP31, DP71 und DPL10) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die am nächsten verwandte bekannte Stammliensequenz dar. Striche bedeuten Identität. Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

30

Tabelle 7b

A. Schwere Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP-46	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEHWA	VISYDGSNKKYADSVKG	RTTISRDNISKRTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAR	DSETAIAAAGRFDI	WGQGTHTVTSS
AI-B14	--K-L-----	D-G--	-----	A-----	--S-----N-----ST-----F-----	-----	-----
AI-B17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DP-10	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFS	SYAIS	WVRQAPGQGLEHMG	GIIPIFGTANYAOKFQG	RVTTITADESTSTAYHELSSLRASEDTAVYYCAR	EDGTTVPSPQLEF	WGQGTHTVTSS
AI-B18	--K-LE-----M-----	-HT--	-----	--T-----V-----	-----P-----R--T-DDSGI-----	-----	-----
DP-49	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEHWA	VISYDGSNKKYADSVKG	RTTISRDNISKRTLYLQHNLSRAEDTAVYYCAR	GSGSYLGYYFDY	WGQGTHTVTSS
AI-B24	--K-L-----L-----G-----S-----N-----	K-AI-	-----Y-S	A--SN-G-T-----	-----V-----S-----VR	-----	-----
DP-5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLY	ELSMH	WVRQAPGKGLEHMG	GEFPEGETIYAOKFQG	RVTHTEDTSTDTATHELSSLRASEDTAVYYCAT	GLRSTNYGRILDY	WGQGTHTVTSS
AI-B38	Q-K-LE-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

B. Leichte Ketten

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VL3h	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC	GMHIGSKSVII	WYQOKPGQAPVLVIY	YDSDRPS	FIPERFSGNSGNTATLTLSRVEAGDEADYYC	QVWDSDDH	
AI-B24	-V-----RQ--T---	--YK-----	-----V-	E--Y----	E-----H-----TG-----	----HTH-Q	TI FGSGTKLTVLRQPKAAPSVTLFPPSS

25

FR: Framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (DP46, DP10, DP49, DP5 und VL3h) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die am nächsten verwandte bekannte Stammliniensequenz dar. Striche bedeuten Identität. Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

3. Einfluß von Autoantikörper-Polypeptiden auf die Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen

3.1 Methoden

5

Analyse der Fab-Bindung an EDTA-vorbehandelte Blutplättchen

Ein an Blutplättchen reiches Plasma wurde 30 min mit 10 mM EDTA inkubiert. Biotinylierte PDG-B und PDG-A Polypeptide wurden zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung von PDG-A und PDG-B an Blutplättchen wurden mittels durchflußzytometrischer Analyse unter Verwendung von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gemessen.

10

Aggregationsexperimente

15

An Blutplättchen reiches Plasma ($250 \times 10^9/l$) wurde frisch hergestellt und unter 5% CO_2 gehalten. Das Plasma wurde durch unterschiedliche Verdünnungen an ADP (maximale Konzentration $410 \mu M$) in Abwesenheit oder in Gegenwart von PDG-A oder PDG-B (maximale Menge $10 \mu g$ Fab) aktiviert. Die Aggregation wurde in einem Aggregometer Rodell 300BD-5 (Baxter AG, Düringen, CH) gemessen. In weiteren Experimenten wurde nach Zugabe von PDG-A oder PDG-B polyklonales Anti-Fab-Antiserum zu den aktivierten Plättchen gegeben.

20

Fibrinogen-Bindetest

25

Vertiefungen von ELISA-Platten wurden mit $0,5 \mu g/ml$ GPIIb/IIIa beschichtet und mit 3,5% Rinderserumalbumin in Tris-gepufferter Salzlösung blockiert. Dann wurde Fibrinogen (Kabi Diagnostics, Stockholm, Schweden) in unterschiedlichen Konzentrationen (maximal $0,08 \mu g/ml$) in Abwesenheit oder in Gegenwart von PDG-A, PDG-B oder Anti-IgE Fab zur Kontrolle zugegeben (maximale Konzentrationen $23 \mu g/ml$). Das gebundene Fibrinogen wurde mit

30

Ratten-Anti-Humanfibrogen-Antikörper, biotinyliertem Maus-Anti-Ratten-Antikörper und einem Konjugat aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Dübendorf, CH) unter Verwendung eines ELISA-Easy-Ablesegeräts (EAR340AT, SLT-Instruments, Österreich) bei 405 nm gemessen.

Kompetitionsassay unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 7E3 und des Antikörperfragments ReoPro®

10 An Plättchen reiches Plasma ($230 \times 10^9/l$) wurde für 1,5 h mit PDG-B oder PDG-A (200 bzw. 400 $\mu g/ml$) mit oder ohne dem murinen monoklonalen Antikörper 7E3 oder dessen Fab-Fragment ReoPro® (Gesamtmenge an Fab im Bereich von 10^{14} bis 10^{10}) inkubiert. Nach Fixieren mit einem gleichen Volumen an 1 % Paraformaldehyd wurde die Bindung von PDG-B und PDG-A
15 an Plättchen mittels durchflußzytometrischer Analyse unter Verwendung von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gemessen.

3.2 Ergebnisse

20 Die getesteten rekombinanten Anti-GPIIb/IIIa Fab Autoantikörperfragmente zeigen keine Bindung an Blutplättchen, die mit 10 mM EDTA vorbehandelt worden waren. Dies zeigt, daß die Autoantikörperfragmente nur ein in seiner Konformation intaktes Antigen erkennen (Fig. 3).

25 In Aggregationsexperimenten, bei denen an Plättchen angereichertes Plasma verwendet wurde, zeigten PDG-A oder PDG-B keine Hemmung der Aggregation. In einem Fibrinogenbindetest, bei dem die Fibrinogenkonzentration 10^4 bis 10^6 mal geringer als in Serum ist, wurde die Fibrinogenbindung durch PDG-A und PDG-B vollständig gehemmt (Fig. 4). Bei Ver-
30 wendung von Anti-IgE Fab als Kontrolle, das durch ein ähnliches Anreicherungsprotokoll erhalten wurde, trat keine Hemmung auf. Diese Ergebnisse

zeigen, daß sowohl PDG-A als auch PDG-B eine starke Wechselwirkung mit der Fibrinogenbindestelle auf GPIIb/IIIa zeigen.

5 In Untersuchungen mit dem murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa Antikörper 7E3 und dessen kommerziell erhältlichen Fab-Fragment ReoPro®, die beide die Fibrinogenbindung an aktiviertes GPIIb/IIIa hemmen, wurde eine selektive und vollständige Hemmung der PDG-B Bindung an Blutplättchen gefunden (Figuren 5 bis 7). In Gegensatz dazu wurde die Bindung von PDG-A an Blutplättchen weder durch 7E3 noch durch ReoPro® signifikant
10 gehemmt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 30

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19723904.8
- (B) ANMELDETAG: 06-JUN-1997

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19755227.7
- (B) ANMELDETAG: 12-DEC-1997

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19820663.1
- (B) ANMELDETAG: 08-MAY-1998

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..357

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
ACC CTG TCC CTC AAC TGC ACT GTC TCT GGT CGC TCC ATC AGT GGT TAC	96
Thr Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr	
20 25 30	
TCT TGG AGA TGG ATC CGG CAG TCT CCA GGG AAG GGA CTA GAG TGG ATT	144
Ser Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
GGG GAT ATC TCT TAT AGT GGG AGT ACC AAG TAC AAA CCC TCC CTC AGG	192
Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg	
50 55 60	
AGT CGA GTC ACC CTG TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG	240

Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu		
65					70					75					80		
AAG	CTG	AAT	TCG	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG		288
Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
CGA	GTC	TTG	CCC	TTT	GAC	CCG	ATC	TCG	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	AAA	GGG		336
Arg	Val	Leu	Pro	Phe	Asp	Pro	Ile	Ser	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly		
			100					105					110				
ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA											357
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
		115															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 119 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu		
1				5					10					15			
Thr	Leu	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Ile	Ser	Gly	Tyr		
			20					25					30				
Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35					40					45					
Gly	Asp	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Lys	Pro	Ser	Leu	Arg		
	50					55					60						
Ser	Arg	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu		
65					70					75					80		
Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85				90						95			
Arg	Val	Leu	Pro	Phe	Asp	Pro	Ile	Ser	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly		
			100					105					110				
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
		115															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	TGG	GTC		48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val		

120	125	130	135	
ACC ATC TCT TGT TCT GGG AGC AGC TCC AAC ATC AGA AGT AAT CCT GTT				96
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Pro Val	140	145	150	
AGC TGG TAT CAC CAG GTC CCA GGC ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TTT				144
Ser Trp Tyr His Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe	155	160	165	
GGT AGT CAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC				192
Gly Ser His Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	170	175	180	
AAG TCG GGC ACC TCC GCC TCC CTG GCC ATC CGT GGG CTC CAA TCT GGG				240
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly	185	190	195	
GAT GCT GGT GAC TAT TAC TGT GCA ACA TGG GAT GAC GGC CTC AAT GGT				288
Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly	200	205	210	215
CCG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA AGT CAG CCC				333
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro	220	225	230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Trp Val																	
1				5				10						15			
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Pro Val			20				25						30				
Ser Trp Tyr His Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe		35				40				45							
Gly Ser His Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	50				55				60								
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly	65			70				75					80				
Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly			85				90						95				
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro		100				105							110				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
115 120 125	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
130 135 140	
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
145 150 155	
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
160 165 170 175	
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
180 185 190	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
195 200 205	
GCG AGA GCG CTG GGG AGC TGG GGG GGT TGG GAC CAC TAC ATG GAC GTC	336
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val	
210 215 220	
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	369
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val	
100 105 110	

- 52 -

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC	48
Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val	
125 130 135	
ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA	96
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val	
140 145 150 155	
AAC TGG TAC CAG CAG CTC CCA GGA ACG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT	144
Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
160 165 170	
AGT AAT AAT CAG CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC	192
Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
175 180 185	
AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG	240
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu	
190 195 200	
GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA GCA TGG GAT GAC AGC CTG AAT GGT	288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly	
205 210 215	
TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC	333
Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
220 225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val	
1 5 10 15	
Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val	
20 25 30	
Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
35 40 45	
Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	

- 53 -

50	55	60
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu		
65	70	75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly		
	85	90 95
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
	100	105 110

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: beides
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTT CAC CCC GGG GGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly	
	115 120 125
TCC CTG AGA CTC TCT TGT GCA GCC TCT GGA TTT ACG TTT GAC AAC TTT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Phe	
	130 135 140
GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC	144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	145 150 155
TCA GGC ATT AGT GGT GGT GGT CTT TTG ACA CAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Leu Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val	
	160 165 170 175
AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA AAC AAT TCC AGG AAC ACT GTA TAC	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ser Arg Asn Thr Val Tyr	
	180 185 190
CTA CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAA GAC ACG GCC GTG TAT TAT TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	195 200 205
GTG AGA GAT CTG GGC TAT AGA GTA CTT TCG ACT TTT ACT TTT GAT ATC	336
Val Arg Asp Leu Gly Tyr Arg Val Leu Ser Thr Phe Thr Phe Asp Ile	
	210 215 220
TGG GGC CAG GGG ACA AAG GTC ACC GTC TCT TCA	369
Trp Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser	
	225 230

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Leu Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ser Arg Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Leu Gly Tyr Arg Val Leu Ser Thr Phe Thr Phe Asp Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 375 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..375

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GTG GTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC	48
Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile	
125 130 135	
ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GCT ATT GGG AAT TAT AAC TTT	96
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Ala Ile Gly Asn Tyr Asn Phe	
140 145 150 155	
GTC CCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT	144
Val Pro Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile	
160 165 170	
TAT GAG GGC AGT AAG CGG CCC TCA GGG GTT TCT AAT CGC TTC TCT GGC	192
Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly	
175 180 185	
TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACA ATC TCT GGG CTC CAG GCT	240
Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala	
190 195 200	
GAG GAC GAG GCT GAG TAT TAC TGC TGC TCA TAT GTT CAT AGT AGC ACT	288
Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Val His Ser Ser Thr	
205 210 215	
AAT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC	336
Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	

220	225	230	235	
AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCA CCC TCC TCT				375
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser				
	240	245		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 125 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile
1				5					10				15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe
		20					25					30			
Val	Pro	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile
	35					40						45			
Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala
	65				70				75					80	
Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr
		85						90						95	
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro
		100						105					110		
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser			
	115						120					125			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCA GGA CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG GAG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Glu	
	130 135 140
ACC CTG TCT CTC ACC TGC ACT GTC TCT GAT GTC TCC ATC AGA AGT CAT	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Val Ser Ile Arg Ser His	
	145 150 155
TAC TGG AGT TGG CTC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT	144
Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
	160 165 170

GGG TTT ATC TAT GAC GGT GCG AGA ACC AGG TTC AAC CCC TCC CTC AGG	192
Gly Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg	
175 180 185	
AGT CGA GTC TCC CTT TCA ATG GAC CCA TCC AAG AAG CAG TTT TCC CTG	240
Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu	
190 195 200 205	
AAA CTG GGG TCT GTG ACC GCT GCG GAC TCG GCC GTC TAC TAC TGT GCG	288
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
210 215 220	
AGA GAC GCG GAT GGA GAT GGC TTC AGC CCA TAC TAC TTT CCC TAC TGG	336
Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp	
225 230 235	
GGC CAG GGA ATC CCG GTC TCC GTC TCC TCG	366
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser	
240 245	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 122 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Val Ser Ile Arg Ser His	
20 25 30	
Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
Gly Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg	
50 55 60	
Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu	
65 70 75 80	
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp	
100 105 110	
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser	
115 120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAC CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg	
125 130 135	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
140 145 150	
ACT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
155 160 165 170	
GCA CTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
175 180 185	
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
190 195 200	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
205 210 215	
GCG AAA GAT GGC CGG AGT GGG AGC TAC GCC AGG TTC GAC GGT ATG GAC	336
Ala Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp	
220 225 230	
GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	372
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
235 240 245	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp	
100 105 110	
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	
125 130 135 140	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
145 150 155	
GCC CTG CAC TGG GTC CGT CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC	144
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
160 165 170	
TCA GGT ATT AGT TGG GAT AGT GGT ACC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG	192
Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val	
175 180 185	
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
190 195 200	
CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	
205 210 215 220	
GTA AAA GAT ATG GGG TCT TCG GTA GTG GCT ACG TAC AAT GCT TTT GAT	336
Val Lys Asp Met Gly Ser Ser Val Val Ala Thr Tyr Asn Ala Phe Asp	
225 230 235	
ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA	372
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
240 245	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr	
20 25 30	
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	

Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Met Gly Ser Ser Val Val Ala Thr Tyr Asn Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 360 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): AI-X2

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..360

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCA GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
125 130 135 140	
ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC TTC AGT ACT TAC	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr	
145 150 155	
TAT TGG AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT	144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
160 165 170	
GGG TAT ATC TAT TAC AGT GGG AAC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG	192
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
175 180 185	
AGT CGA GCC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG	240
Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	
190 195 200	
AAG CTG AGC TCT GTT ACC GCC GCA GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG	288
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
205 210 215 220	
AGA CTG CGT AAC GAT GGC TGG AAT GAT GGC TTT GAT ATC TGG GGC CAA	336
Arg Leu Arg Asn Asp Gly Trp Asn Asp Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln	
225 230 235	
GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA	360
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
240	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 120 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

```

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1              5              10              15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Thr Tyr
              20              25              30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
              35              40              45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
              50              55              60
Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
              65              70              75              80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
              85              90              95
Arg Leu Arg Asn Asp Gly Trp Asn Asp Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln
              100              105              110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
              115              120

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): AI-B14

(viii) POSITION IM GENOM:

- (A) CHROMOSOM/SEGMENT: 14
- (B) KARTENPOSITION: q32.3

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

```

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG      48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
              125              130              135

TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
              140              145              150

```

GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
155 160 165	
GCA GCT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAC AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG	192
Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
170 175 180	
AAG GGC CGA TTC TCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAC AAT ACG CTA TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr	
185 190 195 200	
CTG CAA ATG AGC ACC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTC TAT TTC TGT	288
Leu Gln Met Ser Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
205 210 215	
GCG AGA GAT TCG GAA ACG GCA ATA GCG GCA GCT GGA CGG TTT GAT ATC	336
Ala Arg Asp Ser Glu Thr Ala Ile Ala Ala Ala Gly Arg Phe Asp Ile	
220 225 230	
TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA	369
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
235 240	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Ser Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
Ala Arg Asp Ser Glu Thr Ala Ile Ala Ala Ala Gly Arg Phe Asp Ile	
100 105 110	
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (B) CLON(E): AI-B18
- (viii) POSITION IM GENOM:
 (A) CHROMOSOM/SEGMENT: 14
 (B) KARTENPOSITION: q32.3
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..366
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT	GGG	TCC	48
Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
125							130				135					
TCG	GTG	ATG	GTC	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	GGC	ACC	TTC	AGC	AGC	CAT	96
Ser	Val	Met	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	His	
140					145					150					155	
ACT	ATC	AGC	TGG	GTG	CGG	CAG	GCC	CCT	GGA	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATG	144
Thr	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
				160					165					170		
GGA	GGG	ATC	ACC	CCT	ATC	TTT	GGT	ACA	GTG	AAC	TAC	GCA	CAG	AAG	TTC	192
Gly	Gly	Ile	Thr	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Val	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
			175					180					185			
CAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATT	ACC	GCG	GAC	GAA	CCC	ACG	AGC	ACA	GCC	TAC	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		190					195					200				
ATG	GAA	CTG	AGG	AGC	CTG	ACA	TCT	GAC	GAC	TCG	GGC	ATC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
	205					210					215					
GCG	AGA	GAA	GAT	GGC	ACT	ACA	GTA	CCA	AGT	CAA	CCC	CTT	GAG	TTC	TGG	336
Ala	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Val	Pro	Ser	Gln	Pro	Leu	Glu	Phe	Trp	
220					225					230					235	
GGC	CAG	GGA	ACC	CGG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCT							366
Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
				240				245								

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 122 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gln | Val | Lys | Leu | Leu | Glu | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ser | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Ser | Val | Met | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Gly | Thr | Phe | Ser | Ser | His | |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
| Thr | Ile | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | |
| | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

Gly Gly Ile Thr Pro Ile Phe Gly Thr Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Pro Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Gly Thr Thr Val Pro Ser Gln Pro Leu Glu Phe Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 363 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): AI-B24

(viii) POSITION IM GENOM:

- (A) CHROMOSOM/SEGMENT: 14
- (B) KARTENPOSITION: q32.3

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 1..363

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
125 130 135	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT TCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AAT AAA TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr	
140 145 150	
GCA ATA CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGA CTG GAA TAT GTT	144
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val	
155 160 165 170	
TCA GCT ATT AGT AGT AAT GGG GGT AAC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ser Ala Ile Ser Ser Asn Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
175 180 185	
AAG GGC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG GTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr	
190 195 200	
CTT CAA ATG AGC AGT CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
205 210 215	
GTT AGA GGA AGT GGG AGC TAC TTA GGA TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
Val Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
220 225 230	

CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 235 240

363

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 121 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Ser Asn Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 (B) CLON(E): AI-B24

- (viii) POSITION IM GENOM:
 (A) CHROMOSOM/SEGMENT: 22
 (B) KARTENPOSITION: q11

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..366

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GTG GTG ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG GCT CCA AGA CAG ACG GCC
 Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Arg Gln Thr Ala
 125 130 135

48

ACG ATT ACC TGT GGG GGA TAC AAG ATT GGA AGT AAA AGT GTC CAC TGG	96
Thr Ile Thr Cys Gly Gly Tyr Lys Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp	
140 145 150	
TAC CAA CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTA TTG GTC GTC TAT GAG GAT	144
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Glu Asp	
155 160 165	
TCC TAC CGG CCC TCA GAG ATC CCT GAG CGA TTC TCT GGC TCC AAC TCT	192
Ser Tyr Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser	
170 175 180 185	
GGG AAC ATG GCC ACC CTG ACC ATC ACC GGG GTC GAA GCC GGG GAT GAG	240
Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu	
190 195 200	
GCC GAC TAC TAC TGT CAG GTG TGG GAT AAT ACT AAT GAT CAG ACG ATA	288
Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Thr Asn Asp Gln Thr Ile	
205 210 215	
TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA CGT CAG CCC AAG GCT GCC	336
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro Lys Ala Ala	
220 225 230	
CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCG CCC TCC TCT	366
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser	
235 240	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 122 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Arg Gln Thr Ala	15
1 5 10	
Thr Ile Thr Cys Gly Gly Tyr Lys Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp	30
20 25 30	
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Glu Asp	45
35 40 45	
Ser Tyr Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser	60
50 55 60	
Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu	80
65 70 75 80	
Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Thr Asn Asp Gln Thr Ile	95
85 90 95	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Gln Pro Lys Ala Ala	110
100 105 110	
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser	120
115 120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON(E): AI-B38

(viii) POSITION IM GENOM:

(A) CHROMOSOM/SEGMENT: 14

(B) KARTENPOSITION: q32.3

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
125 130 135	
TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA TTA	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu	
140 145 150	
TCC ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG	144
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	
155 160 165 170	
GGA GGT TTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAA TTC	192
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe	
175 180 185	
CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACG GCC TAC	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr	
190 195 200	
ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
205 210 215	
GAG ACA GGT CTG AGG TCG TAC AAC TAT GGT CGT AAC CTT GAC TAT TGG	336
Glu Thr Gly Leu Arg Ser Tyr Asn Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Tyr Trp	
220 225 230	
GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	366
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
235 240	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 122 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu	
20 25 30	

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Glu Thr Gly Leu Arg Ser Tyr Asn Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers,
ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine
CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
V L P F D P I S M D V (I)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
A L G S W G G W D H Y M D V (II)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäurese-
quenz aus (a) oder (b) kodiert und

(d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-
Region ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
G Y S W R (III)
kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S Y A M H (IV)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- 69 -

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)

10 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)

15 kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

25 A T W D D G L N G P V (VII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

30 A A W D D S L N G W V (VIII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- 70 -

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und

5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:

10

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I R S N P V S (IX)
kodierenden Nukleotidsequenz,

15

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S G S S S N I G S N T V N (X)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

20

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:

25

(a) einer für die Aminosäuresequenz:
G S H Q R P S (XI)
kodierenden Nukleotidsequenz,

30

(b) einer für die Aminosäuresequenz:
S N N Q R P S (XII)
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5 7. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:
V R D L G Y R V L S T F T F D I (XIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
15 D G R S G S Y A R F D G M D V (XIV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer für die Aminosäuresequenz:
M G S S V V A T Y N A F D I (XV)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 20 (d) einer für die Aminosäuresequenz:
D A D G D G F S P Y Y F P Y (XVI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (e) einer für die Aminosäuresequenz:
25 L R N D G W N D G F D I (XVII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (f) einer für die Aminosäuresequenz:
D S E T A I A A A G R F D I (XVIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (g) einer für die Aminosäuresequenz:
E D G T T V P S Q P L E F (XIX)
kodierenden Nukleotidsequenz,

- 72 -

- (h) einer für die Aminosäuresequenz:
G S G S Y L G Y Y F D Y (XX)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (i) einer für die Aminosäuresequenz:
5 G L R S Y N Y G R N L D Y (XXI)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (j) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c)
10 oder (d) kodiert und
- (k) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen
GPIIb/IIIa kodiert.

15 8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, weiterhin umfassend eine CDR1-
oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7a oder
b gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80%
homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.

20 9. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein
funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR
3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:
25 C S Y V H S S T N (XXII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:
Q V W D N T N D Q (XXIII)
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise

- 73 -

mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert und

- (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

10. Nukleinsäure aus Anspruch 9, weiterhin umfassend eine CDR1- oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7a oder b gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.

11. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er

- (a) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält oder
(b) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 enthält.

12. Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie

- (a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder
(b) eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und eine Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 exprimiert.

- 74 -

13. Polypeptid,
dadurch gekennzeichnet,
daß es

- 5 (a) von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3
oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis
6 oder
(b) von einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und einer
Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 kodiert ist.

10 14. Polypeptid nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable
Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.

15 15. Polypeptid nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable
Domäne der L-Kette umfaßt.

20 16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.

25 17. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis
16.

30 18. Antikörper nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten
Antikörperkette des Polypeptids gerichtet ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, einen Vektor nach Anspruch 11, eine Zelle nach Anspruch 12, ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder 18, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffen enthält.
20. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10 eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12, eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16, eines Antikörpers nach Anspruch 17 oder 18 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von AITP.
21. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12, eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels zur Beeinflussung der Bindung von Fibrinogen an Blutplättchen.
22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Mittels für die Modulation der Blutgerinnung, insbesondere für die Auflösung von Thromben oder/und für die Prävention der Thrombenbildung.
23. Verfahren zur Gewinnung von Phagemid-Klonen, die Nukleinsäuren exprimieren, die für Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa oder für gegen diese Autoantikörper gerichtete antiidiotypische Antikörper kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Phagemid-Bibliothek aus Lymphozyten eines humanen Spenders herstellt und die gewünschten Phagemid-Klone durch

- 76 -

Affinitätsselektion, umfassend negative und positive Selektionsschritte, gewinnt.

24. Verfahren nach Anspruch 23,

5

dadurch gekennzeichnet,

daß man Antikörper-kodierende Nukleinsäuren aus den Klonen gewinnt.

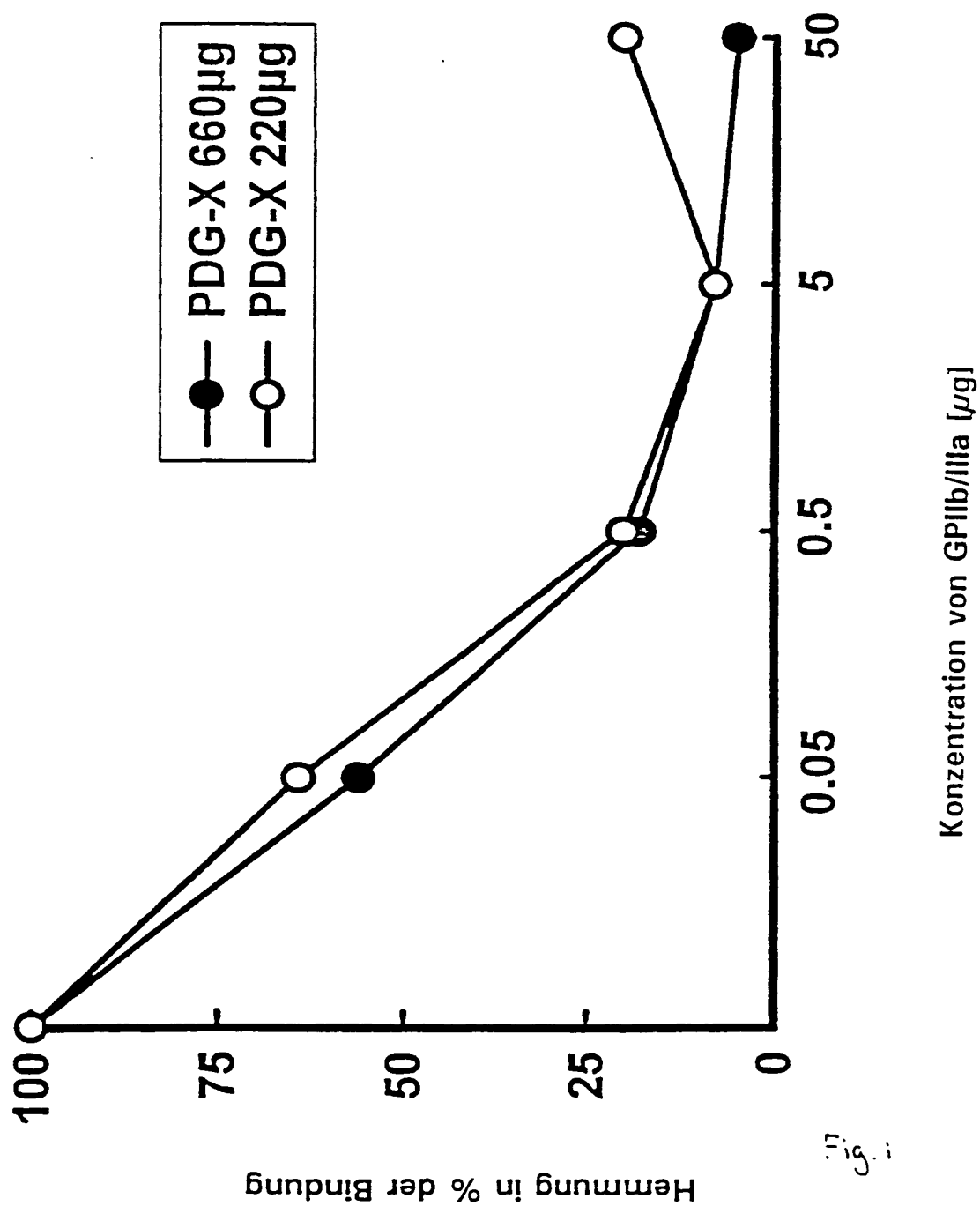
25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24,

10

dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren zur Expression von rekombinanten Antikörperketten, Derivaten oder Fragmenten davon verwendet.

1 / 7



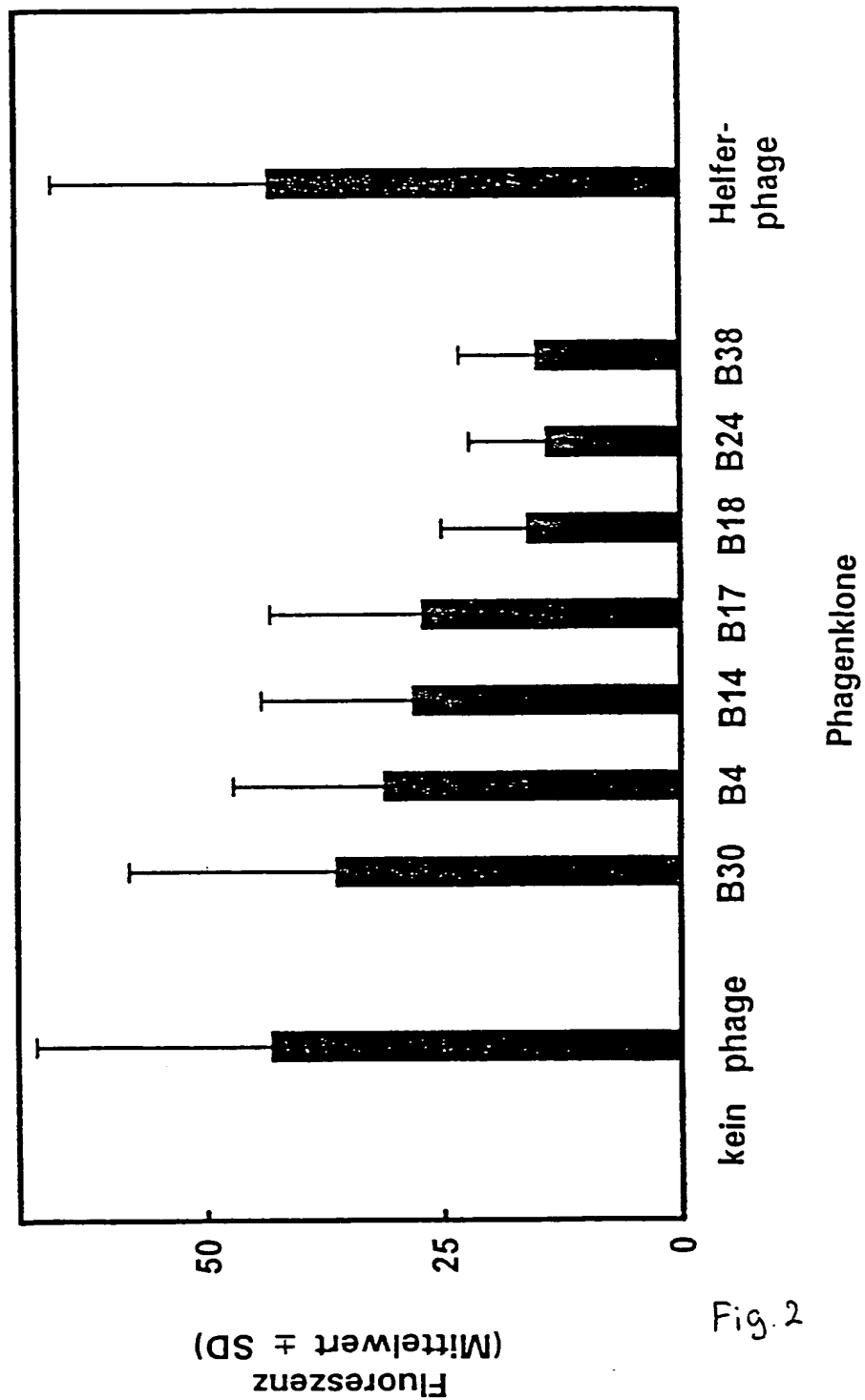


Fig. 2

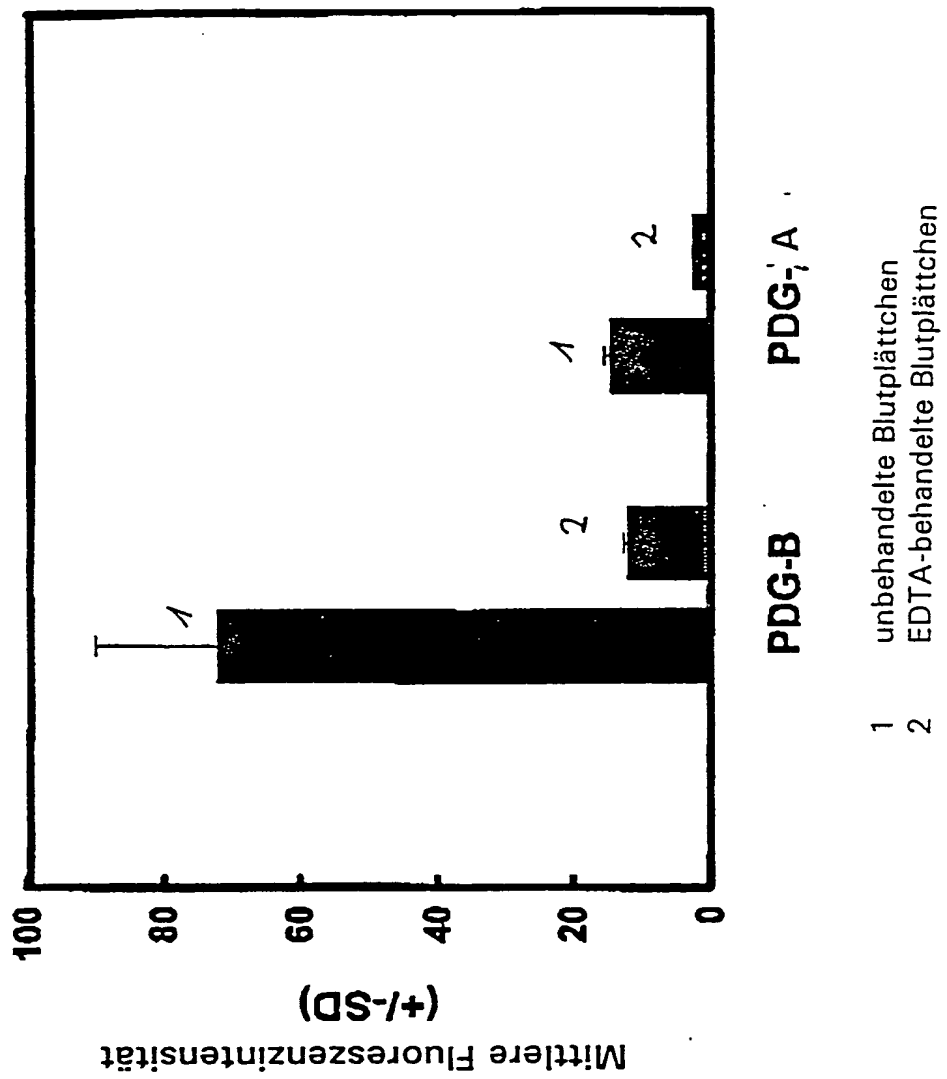
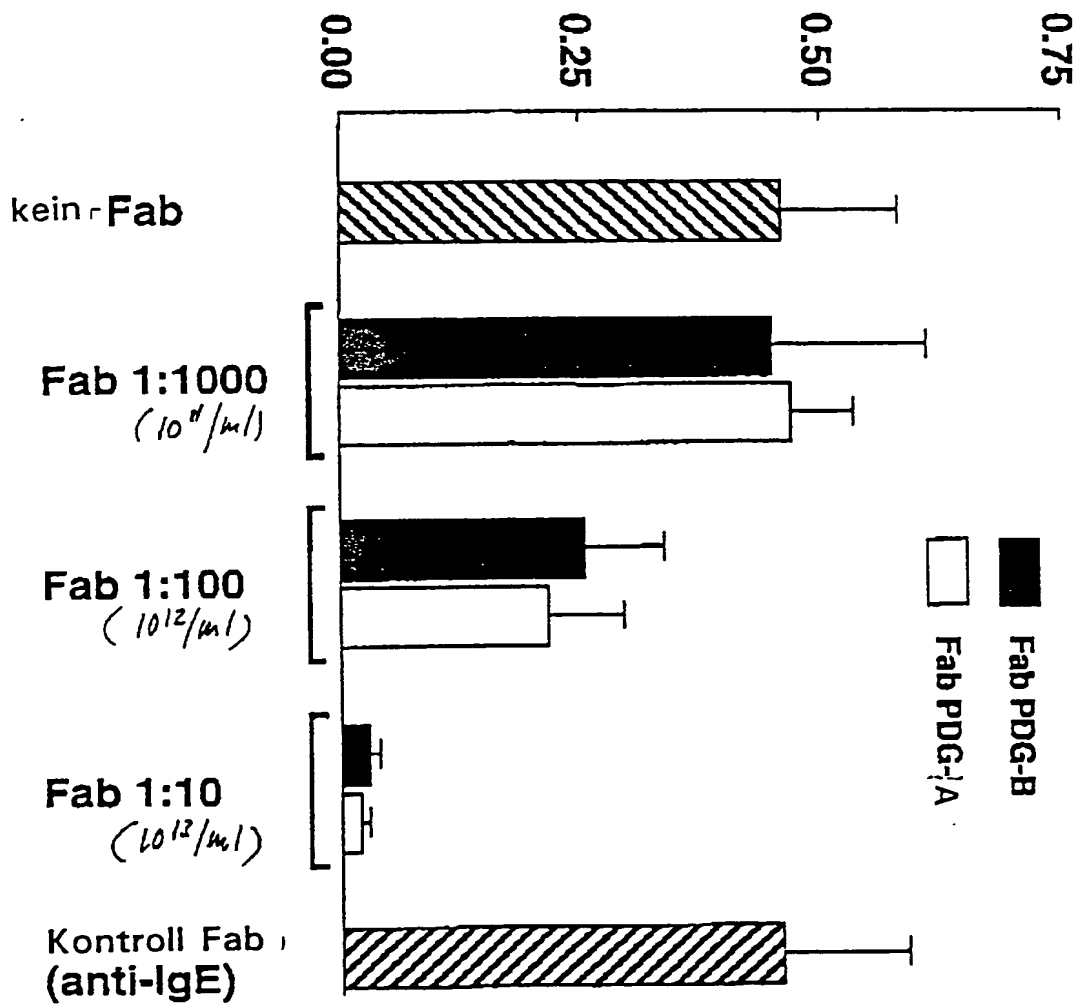


Fig. 3

Fibrinogenbindung
(mittlere OD \pm SD)

Fig. 4



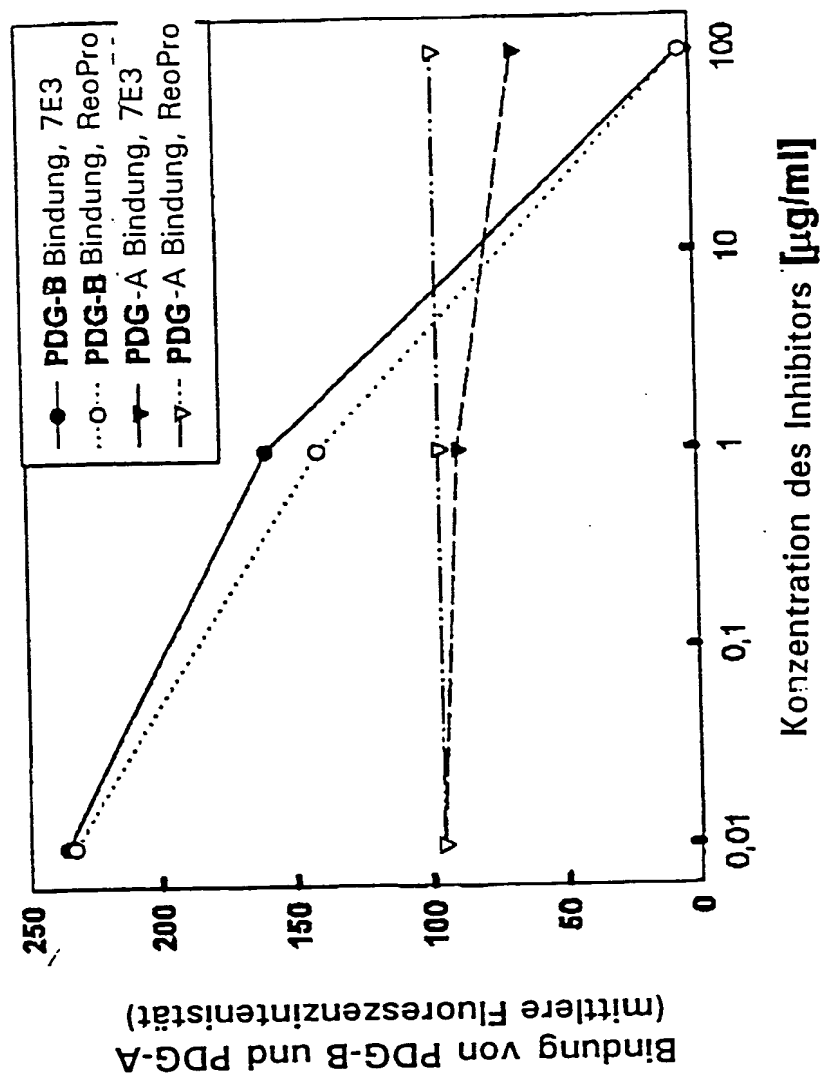


Fig. 5

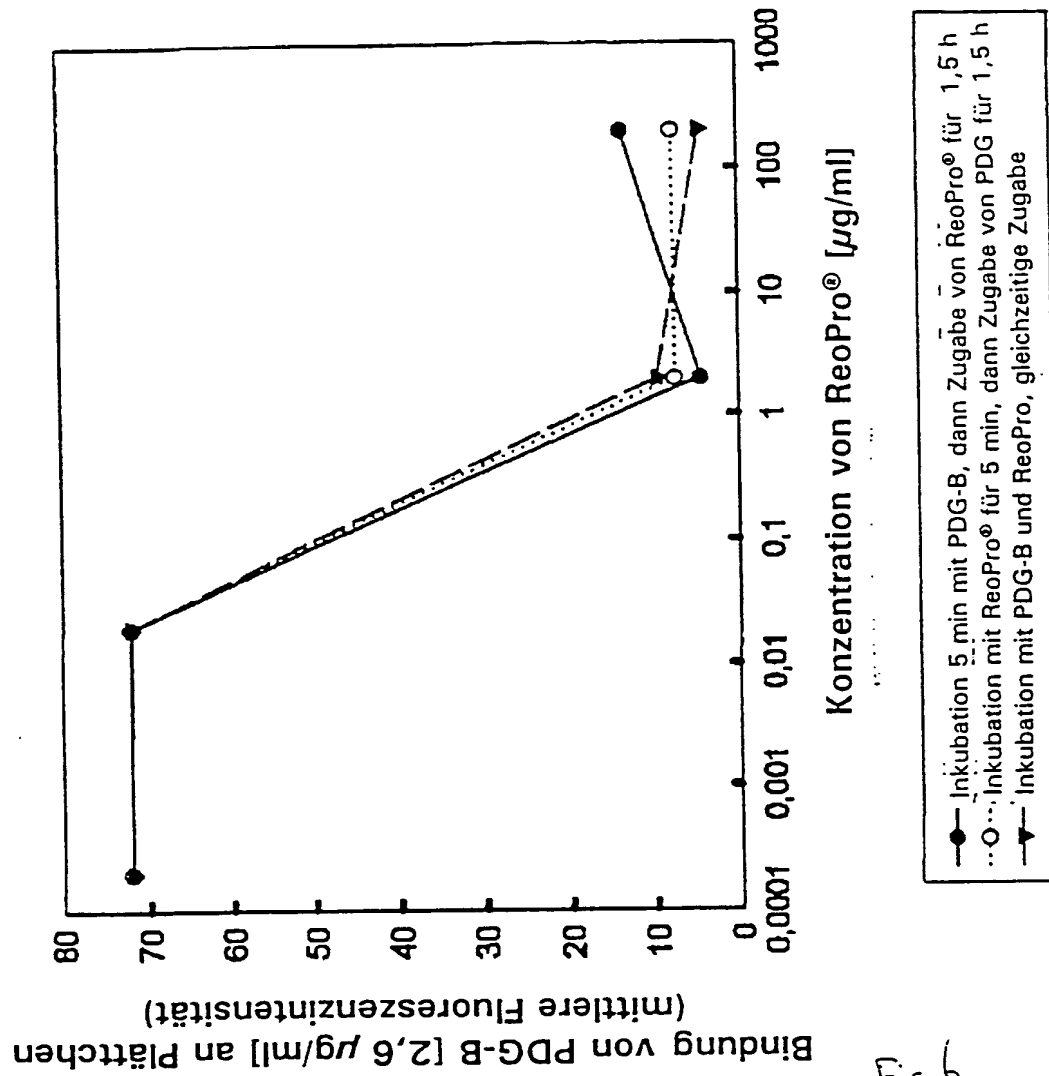


Fig. 6

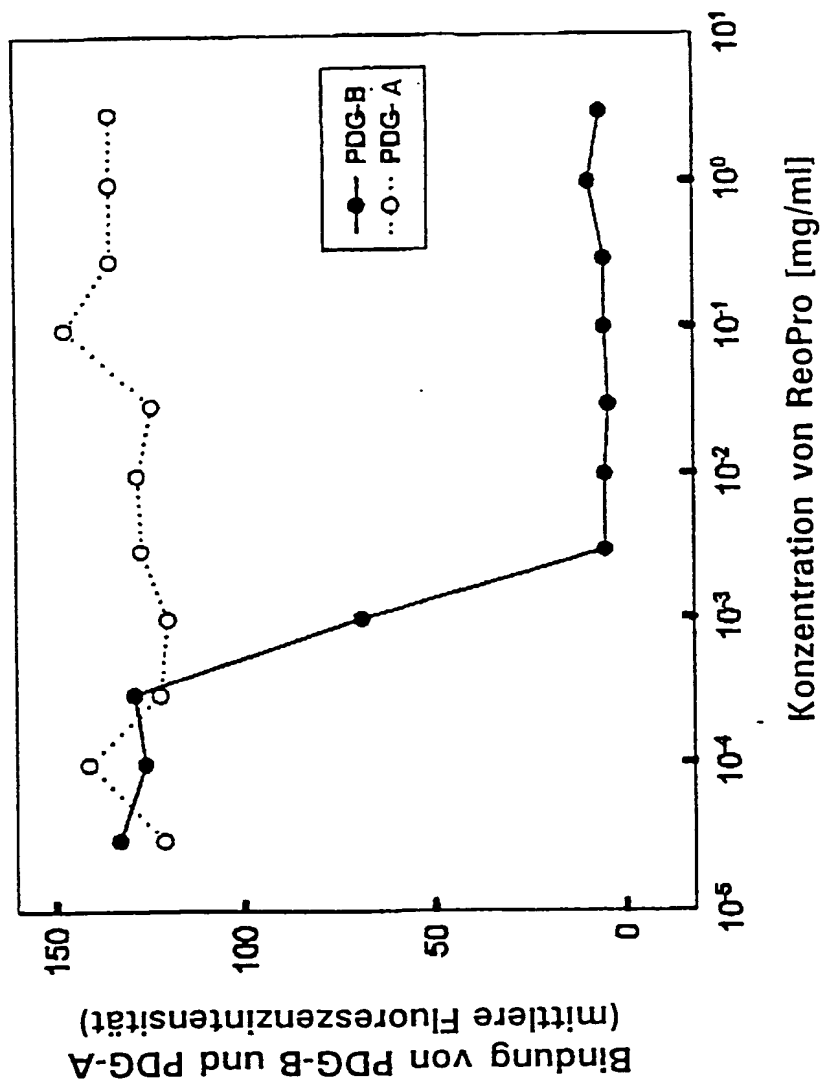


Fig. 7